

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 10 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18960

研究課題名(和文)新規電顕三次元再構築法による足細胞の突起形成・退縮過程の解析

研究課題名(英文)Developmental and pathologic alteration of podocyte 3D structure

研究代表者

市村 浩一郎 (Ichimura, Koichiro)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：10343485

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：足細胞の高度な突起構造は糸球体濾過バリアの形成に重要な役割を果たしている。この突起構造は発生初期の単純な細胞から形成され、病態時には退縮し扁平な突起に再構築されることが知られている。しかし、足細胞の複雑性や培養下で突起構造が再現されない等の理由から、突起の形成・退縮がどのような形態的プロセスを経て進行するのかが不明なままである。本研究では新規の三次元電子顕微鏡技術(ブロック断面SEM観察法)を活用し、足細胞における突起形成・退縮過程を三次元的に明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Podocytes are well known to have a unique 3D architecture specialized for glomerular filtration. However, several 3D morphological aspects on podocyte planarization and degeneration remain fragmentary because they are difficult to reveal by conventional scanning electron microscopy. Here, we adopted FIB/SEM tomography, a powerful tool for analyzing the three-dimensional cellular ultrastructure, to precisely reveal the morphological process of podocyte development and the morphological process of podocyte planarization in puromycin aminonucleotide (PAN) nephrosis rats, an animal model for human minimal change nephrotic syndrome.

研究分野：解剖学、三次元超微形態解析

キーワード：足細胞 ポドサイト スリット膜 細胞間結合装置 三次元超微形態解析 FIB/SEM 糸球体発生 ネフローゼ症候群

1. 研究開始当初の背景

腎系球体の足細胞は系球体濾過バリアを形成する上皮細胞であり、高度に発達した突起構造を有する。足細胞は3種のコンパートメント(細胞体、一次突起、足突起)からなり、教科書的には「細胞体から一次突起が、さらに一次突起から足突起が順次伸び出る」と記載される。足細胞の突起構造は発生期に円柱状の単純な細胞から形成されることが分かっているが、どのような形態的プロセスを経て形成されるのかは不明なままである。さらに、様々な系球体疾患において、足細胞の一次突起と足突起(のコンパートメント構造)は失われるが、この形態的プロセスもよく分かっていない。

足細胞でのコンパートメント構造の消失は系球体濾過バリアの機能低下や足細胞の系球体基底膜からの脱落につながることから、突起形成・退縮メカニズムの解明は系球体疾患における足細胞の新規保護療法の開発や治療薬の作用機序の理解にとって重要である。にもかかわらず、*in vivo*の足細胞における突起形成・退縮の形態的プロセスそのものが不明のまま放置されてきたのには幾つかの理由がある。複雑な構造ゆえ、透過電顕で限られた断面を観察するだけでは全体像をイメージするのが困難であること。走査電顕においても細胞の全体像が一見よく分かるが、足細胞どうしは複雑に突起を入り組ませるため、肝心の足突起領域の観察が存分に行えないこと、などがその理由として挙げられる。これらの問題を克服し、突起形成・退縮過程における足細胞の立体構造を超微形態レベルで把握するには、連続超薄切片の透過電顕像をもとに個々の足細胞を再構築し、任意の方向から立体像を観察することが最良の手法と言える。ただし、連続超薄切片の作製と撮影には熟練の技術と多大な労力・時間を要するため、一般の研究者がこれを利用することは難しい。

しかし、近年、医学・生物学領域に導入が進んできた新しい電子顕微鏡技術(連続SEM断面観察法)により、エポキシ樹脂に包埋された生物試料から連続超薄切片像に匹敵する画像シリーズ(数百~数千枚)を自動的に撮影することが可能となり、特に神経科学領域で活用が進みつつある。研究代表者は足細胞の立体構造解析における連続SEM断面観察法の有用性に早くから着目しており、既に成熟足細胞について連続断面像から作製した三次元再構築像の解析を進めてきた。

連続断面像からの再構築像は通常のTEM像、SEM像の知見を良く再現していると共に、通常は観察が難しい足細胞の接着面(「足の裏」)の解析を可能にし、足突起が一次突起から伸び出す様式が初めて明らかとなった。つまり、足突起は一次突起の側面から単純に伸び出すのではなく、一次突起の下面に突出した畝状の隆起を介し、一次突起から伸び出

す。また、細胞体の下面からも同様の様式で足突起が伸び出すことも判明し、足細胞のコンパートメント構造に関する理解がより正確となった。

2. 研究の目的

足細胞のコンパートメント構造に関する新知見に基づき、足細胞の発生期における突起形成とネフローゼ症候群モデルにおける突起退縮の形態的プロセスを連続SEM断面観察法により解析し、これを明示した「三次元アトラス」を作製する。

3. 研究の方法

発生期の足細胞における突起形成の形態的プロセス

系球体発生期の足細胞において、突起構造が形成される形態的プロセスを連続SEM断面観察法により撮影する。生後1~3日のラットでは、6つの系球体発生段階のほぼ全てを観察することが可能であり、各発生段階において突起の形成状態を立体再構築像から解析する。

実験動物において足細胞のFIB-SEM解析を行う場合には、腎臓を定圧灌流固定することが望ましい。定圧灌流固定とは、固定液を血圧と同等(もしくはそれ以上)の静水圧で動脈内に注入し、目的の臓器を効率よく固定する方法である。この方法は超微形態の死後変化を最小限に抑えるだけでなく、系球体の毛細血管壁をピンと張り詰めたまま固定し、毛細血管表面を覆う足細胞を生時と同じ状態に引き伸ばしておく利点があり、再構築像も美しいものとなる。

連続SEM断面観察法では重金属を主体とした多重ブロック染色により試料を処理する必要があり、ブロック染色のプロトコルはNational Center for Microscopy and Imaging Research (La Jolla, CA, UAS) が公開している標準的なものを用いる。染色後のサンプルはアセトン脱水を施し、一般的なエポキシ樹脂に包埋する。

現在、連続SEM断面観察法が行なえるSEMはブロックの表面を切削する方法により二つのタイプ(FIB/SEMとSBF-SEM)に大別される。腎臓の樹脂包埋標本は血管腔や尿細管腔のように樹脂のみが占めるスペースが多く、撮影時にチャージアップを起しやすい特徴がある。研究代表者らの予備的な検討により、このようなサンプルではFIB/SEM(収束イオンビーム搭載型SEM)を用いるとチャージアップが低減され、歪みの少ない良好な断面像を得られることが分かっており、本研究でもFIB/SEMを利用する。切削厚は50nmとし、500~1000枚の連続断面像を撮影する。

FIB/SEMは主として本学に設置済みのFEI

社製 Helios NanoLab 660 を利用する。FIB/SEM および関連機器一式が利用可能で連続断面像からの足細胞の輪郭抽出（セグメンテーション）と抽出した細胞の立体構築には形態解析・再構築システム Amira 5.1 を用いる。

病態時の足細胞における突起退縮の形態的プロセス

糸球体疾患における足細胞傷害の形態的指標である突起退縮の形態的プロセスを観察するため、突起退縮が顕著に現れるネフローゼ症候群モデル（PAN 腎症ラット）を利用する。PAN 腎症はピューロマイシン化合物をラットに単回投与するだけで安定的に惹起できる。予備的な検討により、投与後 2~7 日の間に突起の再構築が起こることが分かっている。そこで、この間の各病日において、と同様の手法で腎皮質のエポキシ樹脂包埋サンプルを作製し、突起退縮の形態的プロセスを明らかにする。

4. 研究成果

正常な足細胞の立体構造

立体再構築像を表面（腔側面）から見ると、従来の SEM 像をよく再現していた。足細胞は糸球体基底膜に接着しているため、従来の SEM では足細胞を裏面（接着面）から観察することは困難であるが、立体再構築像ならば裏面の観察も容易に行える。意外なことに、裏面は足突起によって占められているように見え、一次突起や細胞体の位置が一見分からない（図 1a, b）。

単一の足細胞の再構築像を観察すると、足突起が一次突起から伸び出る様子を明瞭にすることができる。表面から見ると、一次突起と足突起の関係は葉脈のように見えるが、裏面から見るとその関係はそう単純ではない。一次突起の下面には畝状に隆起した部分（畝状隆起 ridge-like prominence）が形成され、足突起はこの畝から左右に向って伸びている。つまり、畝状の隆起は一次突起の接着装置であるとともに、足突起と一次突起の連結装置であるともいえる。細胞体の下面においても同様な様式で足突起が伸び出しており（図 1e）、足細胞の正確な構造階層は図 2b のようになっていると言える。

また、先述したように、複数の足細胞が連結した状態だと裏面が足突起に占領されているように見えるが、これは畝状隆起の幅が足突起とほぼ同じであるため、細胞体や一次突起から出る畝状隆起を足突起と区別し難いことによる。

隣接する 2 つの足細胞間にはスリット膜が形成されるが、3 細胞間結合部の構造はこれまで分かっていなかった。FIB-SEM 解析では、しばしば足細胞の 3 細胞間結合部を見付ける

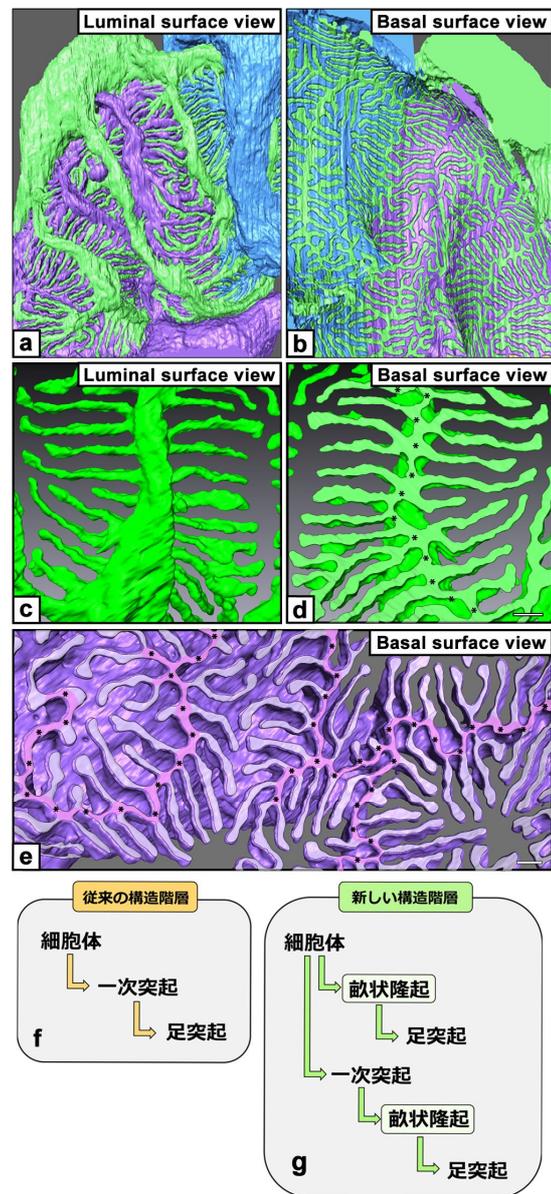


図 1 正常な足細胞の立体再構築像と構造階層性

ことができ、この部位ではスリット膜が形成されず形態的にはタイト結合をなすことが分かった。3 細胞間結合部の同定は通常の TEM では不可能であり、これも FIB-SEM 解析により初めて判明したことのひとつである。

以上の研究成果は Ichimura K, et al. *Sci Rep* 5:8993 (2015) として発表することができた。

なお、再構築像は 3D プリンタで出力し、手に取り観察することも可能であり、学生の組織学教材としても活用できるものと思われた。

発生期における足細胞の突起形成過程

糸球体の発生過程は 7 つのステージに区分され、そのうち足細胞の突起形成が見られるのは S-shaped body stage、Capillary loop stage、Maturing glomerulus stage である。好都合なことに、これらのステージは発生期のひとつの

腎臓内で全て観察することができる。

S-shaped body stage では、足細胞は円柱状であり、タイト結合やアドヘレンス結合からなる結合装置複合体で連結され、円柱上皮を成している(図 2a-d)。腔側面から見ると足細胞は敷石状に見えるが、反対に基底側から見ると隣接する細胞間で不規則に入り組んで見える(図 2b)。

次いで、Capillary loop stage の初期には、足細胞は互いに細い突起(原始足突起 primitive foot processes)により噛み合うようになる(図 2e)。結合装置複合体は原始足突起の直上まで下行しているが、原始足突起どうしの間にはスリット膜を含む細胞間結合装置は存在しない(図 2e, yellow band)。さらに発生が進み Capillary loop stage の後期に入ると、足細胞は複数の一次突起を形成する。これに伴い、結合装置複合体は一次突起を縁取って位置するようになる(図 2f,g)。原始足突起は主に一次突起から伸び出し、長さが増すとともに、分岐したものも見られるようになる。

Maturing glomerulus stage になると、一次突起は太さと長さを増す。結合装置複合体は原始足突起どうしの間位置するようになり、足突起は未熟足突起(immature foot processes)となる。一次突起の成熟過程は均一ではなく、ひとつの足細胞内に様々な成熟段階が見られる。始め一次突起は広い面積で基底膜と接着しているが、その接着面が徐々に狭まり、畝状隆起となる。

未熟足突起間の細胞間結合装置はスリット膜に置き換わると、足突起間にスリット間隙ができ、未熟足突起は成熟足突起(mature foot processes)となる。さらに生後の発達過程で足突起内にアクチン線維の太い束が形成され、高い糸球体内圧から糸球体壁を保護するうえで役立つものと推測される。

以上の研究成果は Journal of Cell Science 誌の特集号「Special issue on 3D Cell Biology」に掲載され、国内外の研究者から高い評価を得ている(Ichimura K, et al. *J Cell Sci* 130: 132-142, 2017)。

病態時における足細胞の突起消失過程

正常な足細胞では、細胞体と一次突起の下面に細い畝状隆起が形成されている。足突起は畝状隆起の左右から櫛の歯のように左右に伸び出ており、足細胞は畝状隆起と足突起により基底膜と接着する。PAN 腎症の初期では、足突起の又の部分に「水掻き」ができるようにして、畝状隆起が拡大し、細胞体と一次突起が広い面積で基底膜と接着するようになる。また、足突起の根元は水掻きの形成により細胞体や一次突起に取り込まれ、短縮することになる。最終的に一次突起は広いシート状の突起に変化し、辺縁に短い不整な足突起を残すのみとなる。

突起の退縮途中で先端部が本体から切り離され、断片がシート状突起と基底膜の間に

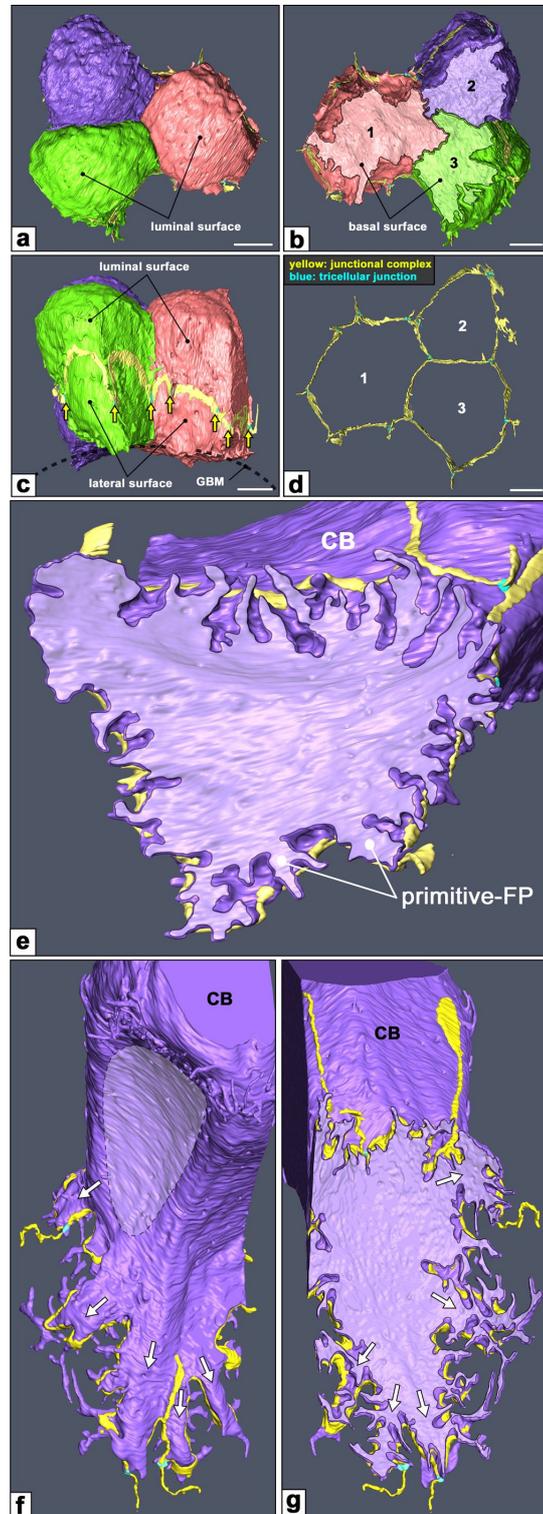


図2 発生期の足細胞(再構築像)

取り残される場合がしばしば観察された。断片の大きさは様々であり、基底膜と接着を保っているように見える場合もあれば、シート状突起に食い込んでこれにトンネル状の通路を形成してポウマン腔に脱落しつつあるものも見られる。PAN 腎症では細胞全体の基底膜からの脱落は比較的まれであり、断片化した細胞質のみが脱落していくようである。進行性腎炎モデルでは足細胞により強い傷害をきたし、細胞全体が基底膜から剥離・脱

落する。したがって、細胞全体の脱落過程を解析するには、他のモデル(抗 GBM 抗体腎炎など)を観察する必要がある。

正常な足細胞では足突起は必ず隣接細胞のそれと細胞間結合装置(スリット膜)を形成する。しかし、突起退縮の過程において、細胞質断片が形成され、これが脱落した場合に Autocellular tight junction が形成される場合が頻繁に認められる。これは脱落部を緊急的に閉鎖するために有用なものと推測される。

突起消失過程に関する研究成果は原著論文として投稿中である。

FIB/SEM 法による解析の課題

FIB/SEM 法によりこれまで認識されていなかった足細胞の立体構造が明らかになり、足細胞の構造解析における本法の威力が証明されたわけだが、いくつかの問題点も浮き彫りになってきた。最も大きな問題となるのは、連続断面像から目的の細胞を抽出する作業(セグメンテーション)をマニュアルで行わなければならない点である。足細胞の複雑性から自動抽出は現時点ではほぼ不可能である。連続像を一枚一枚ながら行う抽出作業は、数百枚の TEM 像を観察することに匹敵し、その過程で重要な所見を見出せることも多々あり、意義のある作業ではあるものの、解析の効率化には高度な自動抽出を可能とした画像解析ソフトの開発が切望される。

FIB/SEM 法ではサンプル(樹脂ブロック)をイオンビームで切削するため、切削部のサンプルは完全に失われる。また長時間撮影するため、撮影領域周辺の樹脂も電子線等によりダメージを受け、観察ができなくなる。したがって、患者由来の腎生検標本のように貴重なサンプルには本法の適用が躊躇われる。

今後の研究展開

今回の研究ではネフローゼ症候群モデル動物における傷害足細胞を検討したが、より傷害の強いモデル(抗基底膜抗体腎炎や Hyman 腎炎など)において、足細胞の脱落過程を検討する予定である。また突起の再生過程についても検討を行い、突起構造がどの程度まで回復できるのかを明らかにする。

ヒトの糸球体疾患において、動物モデルと同様の現象が見られるかどうか検討したいと考えており、腎生検標本の解析も予定している。しかし上記で述べたように、FIB/SEM 法では観察領域が失われてしまうため、アレイトモグラフィ法(AT 法)を適用し、連続断面の撮影を行う予定である。AT 法も SEM 連続断面観察法の一つであり、ダイヤモンドナイフ作製した連続切片をガラス基盤に貼り付け、これを SEM で観察する手法である。ガラス面に貼り付けられた切片は極めて安定であり、再観察が容易で、切

片ライブラリとしてほぼ永久に保存することができる。

5. 主な発表論文等 (研究代表者には下線)

[雑誌論文](計 8 件)

Ichimura K., Miyazaki N, Sadayama S, Murata K, Koike M, Nakamura K, Ohta K, Sakai T. Three-dimensional architecture of podocytes revealed by block-face scanning electron microscopy. *Sci Rep* 5:8993 (2015) 査読有

Ichimura K., Kakuta S, Kawasaki Y, Miyaki T, Nonami T, Miyazaki N, Nakao T, Enomoto S, Arai S, Koike M, Murata K, Sakai T. Morphological process of podocyte development revealed by block-face scanning electron microscopy. *J Cell Sci* 130: 132-142 (2017) 査読有

Ichimura K., Sakai T. Evolutionary morphology of podocytes and primary urine-producing apparatus. *Anat Sci Int* 92:161-172 (2017) 査読有

Ichimura K., Kinose S, Kawasaki Y, Kato K, Sakai T. Reevaluation of the superior radial collateral artery in the human upper arm. *Anat Sci Int* (doi:10.1007/s12565-016-0368-4) 査読有

Hosoyamada Y, Ichimura K., Sakai T. Organ specificity and functional relevance of the arterial structure: a comparative study in the kidney and the skeletal muscle with electron microscopy. *J Vasc Res* 52(4):265-272 (2015) 査読有

[学会発表](計 8 件)

市村浩一郎、角田宗一郎、川崎優人、小池正人、坂井建雄・糸球体足細胞における突起とスリット膜の発生過程～SEM 連続断面観察法を活用した解析～. 第 112 回日本解剖学会全国学術集会(福島県福島市、ビックパレット福島)

市村浩一郎、角田宗一郎、宮木貴之、川崎優人、坂井建雄・傷害足細胞における突起構造の消失過程～FIB/SEM 法を活用した解析～ 第 113 回日本解剖学会全国学術集会(長崎県長崎市、長崎大学医学部)

市村浩一郎、坂井建雄・糸球体内皮細胞の超微形態. 第 17 回腎病理研究会 招待講演(東京都新宿区、慶應義塾大学医学部)

川崎優人、角田宗一郎、宮木貴之、市村浩一郎、坂井建雄・足細胞類縁細胞(ネフロサイト)の超微立体構造～FIB/SEM 法を活用した解析～. 第 113 回日本解剖学会全国学

術集会（長崎県長崎市、長崎大学医学部）

細山田康恵、川崎優人、宮木貴之、角田宗一郎、**市村浩一郎**、坂井建雄．発生期における系球体内皮細胞の窓形成過程～FIB/SEM法を活用した解析～．第113回日本解剖学会全国学術集会（長崎県長崎市、長崎大学医学部）

〔その他〕

研究が紹介されたウェブサイト：

生理学研究所

http://www.nips.ac.jp/nips_research/2016/07/post_172.html

文部科学省ナノテクノロジープラットフォーム
ホーム

<http://nanonet.mext.go.jp/magazine/?plugin=pgid&id=1302>

6．研究組織

(1) 研究代表者

市村 浩一郎（ICHIMURA, Koichiro）

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：10343485